

VERFAHREN ZUR DIAGNOSE VON ERKRANKUNGEN UNTER BESTIMMUNG VON APOLIPOPROTEIN C-1

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Diagnose, Früherkennung, Risikoabschätzung sowie zur Verlaufskontrolle von Erkrankungen, bei denen in Serum- oder Plasmaproben menschlicher Patienten als Biomarker das Protein Apolipoprotein C-I bestimmt wird, sowie die Verwendung von Apolipoprotein C-I als therapeutischer Wirkstoff.

Es ist dabei vorausschickend anzumerken, dass, wenn in der nachfolgenden Beschreibung allgemein von "diagnostischen Verfahren" gesprochen wird, dieser Begriff in der Regel vereinfachend für Verfahren zur Diagnose, Früherkennung, Risikoabschätzung sowie zur Verlaufskontrolle, einschließlich einer therapiebegleitenden Verlaufskontrolle, von Erkrankungen stehen soll, es sei denn, es ergibt sich aus dem konkreten Zusammenhang, dass an der jeweiligen Stelle nur Messungen mit speziellen eingeschränkten Zielsetzungen gemeint sind.

Ferner ist anzumerken, dass im Kontext der vorliegenden Anmeldung der Begriff "Erkrankungen" für in der Regel schwere

chronische und insbesondere akute Erkrankungen verwendet wird und sich nicht auf Störungen des Fettstoffwechsels, wie sie als Risikofaktoren für die Entwicklung einer Atherosklerose angesehen werden, beziehen soll. Als "Erkrankungen" sind insbesondere Krebserkrankungen und Sepsis hervorzuheben. Die erfindungsgemäße Bestimmung kann jedoch auch im Zusammenhang mit diagnostischen Verfahren angewandt werden, die nähere Informationen zum Zustand eines Patienten liefern sollen, der an anderen Erkrankungen leidet, insbesondere einer akuten Herzerkrankung wie einem Herzinfarkt, Angina Pectoris und einer arteriellen Verschlusskrankung, an Diabetes, Morbus Basedow und Morbus Crohn.

Als "Apolipoproteine" werden Proteine bezeichnet, die gemeinsam mit Lipiden (Triglyceriden, Cholesterin, Phospholipiden) die Lipoproteine bilden. Eine wichtige Funktion der Apolipoproteine ist es, den Transport der wasserunlöslichen Lipide in Serum und Plasma zu ermöglichen. Lipoproteine werden aufgrund ihres Wanderungsverhaltens im Dichtegradienten einer Ultrazentrifuge vier verschiedenen Dichteklassen zugeordnet: Chylomikronen, VLDL (von: very low-density lipoproteins), LDL (von: low-density lipoproteins) und HDL (von: high-density lipoproteins). Zusätzlich unterscheidet man eine als Lipoprotein(a) bezeichnete Gruppe. Der Lipidanteil der Lipoproteine ist um so geringer, je höher deren Dichte ist. Lipoproteine unterschiedlicher Dichteklassen unterscheiden sich nicht nur aufgrund der Menge des gesamten vorhandenen Lipidanteils, sondern auch im Hinblick auf dessen Zusammensetzung. Den jeweiligen Dichteklassen lassen sich ferner auch typische Apolipoproteinprofile zuordnen.

Apolipoproteine sind Proteine unterschiedlicher Länge und Aminosäurezusammensetzung, die mit Großbuchstaben A-H bezeichneten Gruppen zugeordnet werden, wobei innerhalb der einzelnen Gruppen nochmals zwischen unterschiedlichen Proteinen unterschieden wird, die durch eine angefügte Zahl charakterisiert werden. An Stelle der vollständigen Bezeichnung von z.B. Apolipoprotein A-I hat es sich eingebürgert, auch einfach nur von

Apo A-I zu sprechen. Die Primärstrukturen (Aminosäuresequenzen) der verschiedenen Apolipoproteine sind bekannt, und für eine Reihe der verschiedenen Apolipoproteine existieren auch Daten oder konkrete Vorstellungen zu ihrer räumlichen Struktur, insbesondere in Assoziation mit Lipiden. Genauere Angaben sind der einschlägigen wissenschaftlichen Literatur entnehmbar.

Es ist bekannt, im Zusammenhang mit der Gewinnung von Meßdaten zum Fettstoffwechsel eines Patienten, insbesondere zur Früherkennung eines Atheroskleroserisikos oder zur Therapie-Kontrolle bei der Behandlung eines Patienten mit lipidsenkenden Medikamenten, auch gezielt Apolipoproteine zu bestimmen. Dabei macht man sich den Umstand zunutze, dass bestimmte Apolipoproteine ausschließlich oder wenigstens überwiegend in Lipoproteinen der einzelnen der oben genannten Lipoproteindichteklassen auftreten und deren Spezifität bestimmen, so dass man durch eine Bestimmung des Apolipoproteinteils von Lipoproteinen auch den Anteil der letzteren in einem Serum oder Plasma eines Patienten ermitteln kann.

Es ist auch bekannt, dass bei einzelnen Patienten aufgrund erblicher Einflüsse, die die Bildung der Apolipoproteine oder der diese spaltenden Enzyme beeinflussen oder sich als Rezeptordefekte äußern, vom Normalfall abweichende Lipoprotein- und auch Apolipoproteinprofile gefunden werden. Es ist ferner bekannt, dass es auch im Gefolge anderer Erkrankungen zu Fettstoffwechselstörungen (sekundären Dyslipoproteinämien) kommen kann, die temporärer Natur sind und nach Heilung der Erkrankung wieder verschwinden (vgl. (20), Seiten 186-189; Literaturverweise in Form von Zahlen in Klammern beziehen sich auf das beigefügte Literaturverzeichnis). Soweit die Veränderungen des Fettstoffwechsels sich auch als Veränderungen der Apolipoprotein-Zusammensetzungen äußern, sind in der wissenschaftlichen Literatur in erster Linie solche Veränderungen dokumentiert, die die Apolipoproteine A-I und A-II betreffen und in der Regel abnorme Formen und Konzentrationen der HDL widerspiegeln. Als Biomarker für die Diagnose von Erkrankungen,

für die bekannt ist, dass sie auch von Fettstoffwechselstörungen begleitet sind, spielen Apolipoproteine jedoch keine nennenswerte praktische Rolle.

Im Rahmen der vorliegenden Anmeldung geht es um die Bestimmung von Apolipoprotein C-I zu diagnostischen Zwecken. Das Apolipoprotein C-I gehört zu einer Gruppe von Apolipoproteinen mit vergleichsweise niedrigem Molekulargewicht, die als die Apolipoproteine Apo C-I, Apo C-II und Apo C-III bezeichnet werden. Die Primärstrukturen dieser drei Proteine sind bekannt (vgl. (1), (2) und, im Hinblick auf Apolipoprotein C-I, insbesondere (3)). Über die Funktion der Apolipoproteine C-I und C-III ist relativ wenig bekannt, und über Veränderungen der Mengen bzw. Formen und Assoziationsformen von Apolipoprotein C-I in humanem Serum oder Plasma in Abhängigkeit von bestimmten Krankheitszuständen liegen keine dokumentierten Erkenntnisse vor. Repräsentativ für Publikationen der wissenschaftlichen Literatur, die Apolipoproteine der Gruppe C bzw. Apolipoprotein C-I betreffen, sind Veröffentlichungen gemäß (1) bis (18), wobei insbesondere die Arbeit gemäß (11) einen guten Überblick darüber liefert, was über die Rolle der Apolipoproteine C im Lipoprotein-Stoffwechsel bekannt ist. Zu den für Apolipoprotein C-I beschriebenen biologischen Effekten gehören in erster Linie die Hemmung des Cholesterinester-Transferproteins (CETP), die Hemmung des dem LDL-Rezeptor (LDLR) zugeordneten Proteins (LRP) und des LDLR selbst und des VLDL-Rezeptors (VLDLR) sowie die Aktivierung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT).

Aus dem Inhalt der genannten Veröffentlichungen sind keine Erkenntnisse ableitbar, die eine Bestimmung von Apolipoprotein C-I als Biomarker zur Diagnose von Erkrankungen, wie z.B. Sepsis oder Krebs, ermöglichen oder eine Bestimmung von Apolipoprotein C-I in den genannten diagnostischen Zusammenhängen nahelegen würden.

Die vorliegende Erfindung ist das Ergebnis von systematischen Forschungsarbeiten der Anmelderin, die zum Ziel haben, Verän-

derungen der Proteinzusammensetzung von Patienten mit Sepsis zu erforschen und die gewonnenen Forschungsergebnisse gezielt für die Sepsis- und Entzündungsdiagnostik nutzbar zu machen.

Ausgangspunkt dieser Forschungen war die Feststellung, dass bei Sepsis das Prohormon Procalcitonin drastisch erhöht ist und dass die Bestimmung von Procalcitonin als Biomarker für Sepsis zur Diagnose und zur therapiebegleitenden Verlaufskontrolle von hohem praktischen Wert ist (vgl. z.B. EP 656 121 B1). Weiterführende Erkenntnisse zur Veränderung der Proteinzusammensetzung im Serum oder Plasma von Sepsispatienten, die bei der Anmelderin ausgehend von unterschiedlichen Forschungsansätzen gewonnen wurden, finden sich beispielsweise in der veröffentlichten Patentanmeldung EP 1 121 600 A2 sowie weiteren veröffentlichten Patentanmeldungen jüngeren Datums wie WO02/085937, WO03/005035, WO03/002600, EP 1 355 158 A1, EP 1 318 406 A1, EP 1 318 407 A1 und EP 1 355 159 A1 und zusätzlichen einschlägigen, noch unveröffentlichten Patentanmeldungen der Anmelderin. Auf den Inhalt der genannten Patentanmeldungen wird insbesondere im Hinblick auf die Erläuterungen zum modernen Verständnis des Begriffs Sepsis und die Bedeutung der Bestimmung von Biomarkern bei Sepsis verwiesen.

Da einige der Untersuchungen gezeigt hatten, dass bei Sepsis auch eine Reihe von Biomarkern signifikant erhöht sind, die traditionell nur als typische Krebsmarker angesehen wurden (vgl. EP 1 318 402 A1, EP 1 318 403 A1, EP 1 318 404 A1 und EP 1 318 405 A1) wurden zunehmend parallel zur Untersuchung von Proben von Sepsispatienten auch Plasma- und Serumproben von Patienten berücksichtigt, die an verschiedenen malignen Tumorerkrankungen litten. In vielen der untersuchten Fälle zeigte es sich, dass einzelne Biomarker, die bei Sepsis erhöht gefunden werden, auch bei Krebspatienten signifikant erhöht sind. In zahlreichen Fällen zeigten sich jedoch auch deutliche Unterschiede, die es verbieten, Sepsiserkrankungen und maligne Tumorerkrankungen in einer simplifizierenden Betrachtungsweise generell als grundsätzlich ähnlich zu behandeln.

Die in der vorliegenden Anmeldung beschriebene Erfindung ist Resultat eines weiteren Forschungsansatzes zur Ermittlung von Proteinen, die sich potentiell als Biomarker für diagnostische Zwecke eignen, weil ihre messbaren Mengen bei Sepsispatienten und ggf. Patienten, die an anderen schweren Erkrankungen, insbesondere entzündlichen Erkrankungen oder Krebserkrankungen, leiden, gegenüber Gesunden signifikant verändert sind. Es wurden dazu HPLC-Profile von Serum- bzw. Plasmafraktionen von Sepsispatienten mit denen von augenscheinlich gesunden Normalpersonen verglichen und signifikante Veränderungen der HPLC-Chromatographie-Profile einer näheren Prüfung unterzogen. Diese Untersuchungen lieferten die Ergebnisse, die zur Grundlage der vorliegenden Erfindung wurden, nämlich dass signifikante Veränderungen in den HPLC-Elutionsprofilen von Serum- oder Plasma-Proben von Patienten erkennbar werden, wenn diese Proben vorher über eine Säule mit einem Chromatographiematerial aufgetrennt wurden, das in der Lage ist, mit hydrophoben bzw. lipophilen Bestandteilen der Probe in Wechselwirkung zu treten und derartige Bestandteile selektiv zu binden ("hydrophobe Interaktionschromatographie"). Werden die an das Chromatographiematerial gebundenen Bestandteile der aufgetrennten Probe anschließend auf geeignete Weise eluiert, wird eine Subfraktion der ursprünglichen Serum- oder Plasmaprobe erhalten, in der Bestandteile, insbesondere auch solche proteini-scher Natur, die in der Lage sind, Wechselwirkungen mit hydrophoben Oberflächen einzugehen, selektiv angereichert sind. Eine Variante eines solchen Verfahrens in Anwendung auf Lipoproteine ist in (19) beschrieben.

Die Auftrennung derartiger Fraktionen von Plasmen bzw. Seren von Patienten mit Sepsis und anderen Erkrankungen mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) lieferte die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende überraschende Erkenntnis, dass in den Seren von Sepsis-Patienten und bestimmten anderen Patienten ein Bestandteil, der in Seren und Plasmen gesunder Normalpersonen in deutlicher Ausprägung zu finden ist, stark vermindert ist oder augenscheinlich völlig fehlt. Die

weiterführenden Untersuchungen zur Natur dieses Bestandteils, die nachfolgend genauer beschrieben werden, ergaben, dass es sich bei dem signifikant verminderten Bestandteil um Apolipoprotein C-I handelt. Anschließend weitere Untersuchungen, die ebenfalls nachfolgend noch genauer beschrieben werden, führten dann zu dem weiteren überraschenden Ergebnis, dass Befunde, die bei einer ersten vorläufigen Auswertung für eine Parallelität der Veränderungen bei Sepsis- und Krebspatienten sprachen, in Wirklichkeit klar gegeneinander abzugrenzen sind und es ermöglichen, durch Messung von Apolipoprotein C-I in Serum oder Plasma von humanen Patienten Sepsiserkrankungen deutlich von Krebserkrankungen zu unterscheiden, was als solches eine Erkenntnis darstellt, die für diagnostische Zwecke nutzbar gemacht werden kann.

Es kann als Aufgabe der vorliegenden Erfindung bezeichnet werden, einen neuen, für diagnostische Bestimmungen geeigneten proteinischen Biomarker aufzufinden und für diagnostische Zwecke nutzbar zu machen, dessen mengenmäßiges Auftreten in humanem Serum oder Plasma sich signifikant von den bei augenscheinlich gesunden Normalpersonen gefundenen Werten unterscheidet und dessen Bestimmung daher ein wertvolles diagnostisches Hilfsmittel darstellt.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren gemäß Anspruch 1 gelöst.

Bevorzugte Ausgestaltungen, insbesondere im Hinblick auf diagnostische Anwendungen bei Sepsispatienten, Krebspatienten und Patienten mit anderen Erkrankungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

Wenn in der vorliegenden Anmeldung bzw. den Ansprüchen als zu bestimmende Spezies neben Apolipoprotein C-I auch "dessen Abkömmlinge" erwähnt werden, so sind darunter insbesondere Fragmente und Aggregate zu verstehen, insbesondere solche, die sich bei dem jeweiligen gewählten Bestimmungsverfahren wie das freie Protein Apolipoprotein C-I verhalten. Die "Abkömmlinge"

können z.B. um einzelne Aminosäuren oder Aminosäuresequenzen verkürzte Apolipoprotein C-I-Moleküle sein, oder auch - z.B. durch Aggregation - sterisch oder konformationell veränderte vollständige Apolipoprotein C-I-Moleküle.

Die neuen Erkenntnisse, die die Verwendung von Apolipoprotein C-I als Biomarker ermöglichen, besagen, daß bei Patienten, die an einschlägigen Erkrankungen leiden, die erfaßbare Menge an Apolipoprotein C-I gegenüber augenscheinlich gesunden Normalpersonen stark erniedrigt ist. Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß bei den genannten Erkrankungen Apolipoprotein C-I in unzureichenden Mengen gebildet, verbraucht und/oder anormal gebunden wird, was sich im Vergleich mit Gesunden als Mangel an Apolipoprotein C-I interpretieren läßt.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung daher auch die Verwendung von Apolipoprotein C-I als Therapeutikum zur Behandlung von krankheitsbedingten Apolipoprotein C-I-Mangelzuständen bzw. zur Herstellung von Medikamenten zur Behandlung von Erkrankungen, die sich auf der diagnostischen Ebene durch eine signifikante Verminderung der messbaren Mengen an Apolipoprotein C-I zu erkennen geben.

Diese Aspekte der Erfindung sind Gegenstand von Anspruch 10.

Alle eingangs und in den Ansprüchen, auf die Bezug genommen wird, wiedergegebenen Sachverhalte und zu schützenden Lehren werden nachfolgend unter Bezugnahme auf experimentelle Daten und zugehörige Figuren noch näher erläutert, wobei gleichzeitig die Bedeutung einzelner, in der vorliegenden Beschreibung verwendeter Begriffe noch ergänzend erläutert wird. Auf die nachfolgenden Ausführungen wird daher zur Auslegung der Patentansprüche und zur Präzisierung der bisherigen allgemeinen Ausführungen ausdrücklich Bezug genommen.

In den Figuren zeigen:

Fig. 1 die Elutionsprofile der Reversphasen C18 HPLC von Serum- bzw. Plasma-Fraktionen, die mit Essigsäure (50 mM) aus Octylsepharose-Chromatographiesäulen eluierbar waren, die mit Seren bzw. Plasmen von (a) augenscheinlich gesunden Normalpersonen, (b) Patienten mit verschiedenen malignen Tumor-Erkrankungen und (c) von Sepsis-Patienten beschickt worden waren, nach einem zwischengeschalteten Waschen der beladenen Säulen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS).

Fig. 2 durch Peakintegration von HPLC-Elutionsprofilen des in Fig. 1 gezeigten Typs erhaltene Relativmengen an eluierbarem Apolipoprotein C-I in Proben von augenscheinlich gesunden Normalpersonen und Patienten, die an Erkrankungen unterschiedlichen Typs litten (Sepsis, Tumor, Herzinfarkt, Angina Pectoris, arterielle Verschlusskrankungen, Morbus Crohn, Morbus Basedow, Autoimmunthyreoiditis, Diabetes Typ I, Diabetes Typ II, rheumatoide Arthritis, Alzheimer Krankheit, HIV positive Seren; jeweils unabhängig klinisch abgesicherte Diagnosen).

Fig. 3 die Standardkurve eines mit zwei affinitäts-gereinigten polyklonalen Apolipoprotein C-I-Antikörpern arbeitenden Sandwich-Immunoassays, wie sie unter Verwendung von synthetischem Apolipoprotein C-I als Standard erhalten wird.

Fig. 4 die Ergebnisse der direkten Bestimmung von Apolipoprotein C-I in Seren und Plasmen von augenscheinlich gesunden Normalpersonen, Sepsis-Patienten und Tumor-Patienten unter Verwendung eines Apolipoprotein C-I-Sandwich-Immunoassays, von dem eine typische Eichkurve in Fig. 3 gezeigt ist; und

Fig. 5 die Ergebnisse einer Wiederholung der Messungen, deren Ergebnisse in Fig. 4 gezeigt sind, nachdem die jeweiligen Proben mit Octylsepharose behandelt worden waren.

Beschreibung der durchgeführten Versuche und der erhaltenen Ergebnisse

A. CHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN

1. Gewinnung von Serum- oder Plasma-Fraktionen, die die an hydrophobe Oberflächen bindenden und von diesen eluierbaren Bestandteile von humanem Serum/Plasma enthalten

Proben von jeweils 0,5 ml von Seren/Plasmen von augenscheinlich gesunden Normalpersonen und von Patienten, die an einer Reihe von unabhängig klinisch diagnostizierten Erkrankungen litten, wurden mit 0,5 ml Octylsepharose-Chromatographiematerial (Bezugsquelle: Pharmacia; 0,25 ml gepacktes Material, gewaschen in PBS) in PBS vermischt und 10 min bei Raumtemperatur bei leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Mischung in eine Polypropylensäule (Durchmesser 5 mm) gefüllt, und durch Waschen mit 20 ml PBS wurden die ungebundenen Substanzen von den an das Octylsepharosematerial gebundenen Substanzen getrennt.

Die Desorption der an das Octylsepharosematerial gebundenen Substanzen (Proteine) erfolgte durch Elution mit 50 mM Essigsäure (pH 2,5).

2. Reversphasen C18 HPLC

Das aus den Octylsepharosesäulen gewonnene Essigsäureeluat wurde jeweils direkt mittels Reversphasen C18 HPLC über eine μ Bondapak C18-Säule (3,9 x 300 mm, Millipore, Waters) analysiert.

Für die HPLC-Chromatographie wurden Gradienten aus einem Laufmittel A (Mischung aus 95 Vol.-Teilen Wasser, 5 Vol.-Teilen Acetonitril, 0,1 Vol.-Teil Trifluoressigsäure) und einem Laufmittel B (10 Vol.-Teile Wasser, 90 Vol.-Teile Acetonitril, 0,1 Vol.-Teile Trifluoressigsäure) verwendet.

Nach dem Auftragen des Essigsäureeluats auf die HPLC-Säule erfolgte die Analyse in folgendem Gradienten aus Laufmittel A/Laufmittel B:

t = 0-5 min von 100/0 (A/B) nach 65/35 (A/B)
t = 5-20 min von 65/35 (A/B) nach 40/60 (A/B)
t = 20-22 min von 40/60 (A/B) nach 0/100 (A/B).

Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Der Säulenausfluß wurde kontinuierlich auf Absorption bei 214 nm vermessen.

Fig. 1 zeigt drei typische Elutionsprofile für Fraktionen aus Proben von augenscheinlich gesunden Normalpatienten (a), von Patienten mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen (b), und von Patienten mit Sepsis (c).

Überraschend zeigte sich, daß die HPLC-Elutionsprofile der genannten Personengruppen sich deutlich und systematisch voneinander unterscheiden. Die für die vorliegende Anmeldung entscheidende Bande ist dabei diejenige, die bei 17,05 min eluiert wird.

Diese Bande wurde mittels Peakintegration für alle untersuchten Serum- und Plasmaproben relativ quantifiziert, und die auf diese Weise ermittelten relativen Substanzmengen für eine Vielzahl von Kontroll- und Patientenproben sind graphisch in Abbildung 2 dargestellt. Im einzelnen wurden folgende Proben untersucht:

42 Proben von Tumor-Patienten (9 x Darmkrebs, 7 x Bronchialkarzinom, 13 x Mammakarzinom, 8 x Ovarialkarzinom, 5 x Pan-

kreaskarzinom), 22 Proben von Sepsis-Patienten, 7 Proben von Herzinfarkt-Patienten (Hi), 4 Proben von Patienten mit Angina Pectoris (APe), 5 Proben von Patienten mit arteriellen Verschlusskrankheiten (AVK), 6 Proben von Patienten mit Morbus Crohn (MC), 11 Proben von Patienten mit Morbus Basedow, 4 Proben mit Patienten mit Autoimmunthyreoiditis (AIT), 10 Proben von Patienten mit Diabetes Typ I (D-Typ I), 6 Proben mit Patienten mit Diabetes Typ II (D-Typ II), 3 Proben von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), 2 Proben von Patienten mit Alzheimer (AD) und 6 Proben von HIV-positiven Patienten).

Wie Fig. 2 sofort entnehmbar ist, werden für Proben von gesunden Normalpersonen deutlich positive Werte für die Substanz gefunden, die dem vermessenen Peak bei 17,05 min entspricht. In den Proben Erkrankter, und zwar ganz besonders deutlich in den Proben von Sepsis-Patienten, Tumor-Patienten, Patienten mit den manifesten/akuten Herzerkrankungen (Hi, APe, AVK) sowie Patienten mit Morbus Crohn werden hoch signifikant erniedrigte Anteile der gleichen Substanz gemessen. Auch für Patienten mit Diabetes Typ I und Diabetes Typ II werden gegenüber Gesunden signifikant, wenn auch nicht im gleichen Maße erniedrigte Werte gefunden. Für Patienten mit Morbus Basedow, Autoimmunthyreoidis, rheumatoider Arthritis, Alzheimer-Krankheit sowie für HIV-positive Patienten sind die entsprechenden Konzentrationsabweichungen geringer bzw. statistisch nicht signifikant.

Die für die einzelnen Proben-Gruppen erhaltenen Mittelwerte der gefundenen Relativmengen sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt:

| Probenart | Mittelwert (relative Absorptions- einheiten) |
|----------------------------------|--|
| Kontrollen | 640 |
| Sepsis | 30 |
| Tumor | 80 |
| Herzinfarkt | 80 |
| Angina Pectoris | 140 |
| Arterielle Verschlaußerkankungen | 80 |
| Morbus Crohn | 80 |
| Morbus Basedow | 320 |
| Autoimmunthyreoiditis | 1130 |
| Typ I Diabetes | 180 |
| Typ II Diabetes | 200 |
| Rheumatoide Arthritis | 1130 |
| Alzheimer | 440 |
| HIV positiv | 480 |

3. Identifizierung der zur Proben-Charakterisierung verwendeten Bande (bei 17,5 min eluierende Bande)

Zur Identifizierung wurde die dieser Bande entsprechende eluierte Substanz aufgefangen, getrocknet (speed vac) und einer Peptid-Analyse unterzogen. Bei einer Sequenz-Analyse des N-Terminus wurde die Sequenz TPDVS ermittelt. Das mittels Massenspektrum (ESI MS) ermittelte Molekulargewicht beträgt 6630 ± 15 D. Diese Ergebnisse korrelierten eindeutig mit den bekannten Daten für das humane Apolipoprotein C-I (vgl. z.B. (3)), das die Peptid-Sequenz gemäß SEQ ID No.1 aufweist (vgl. auch SWISS PROT Accession No. 3660227) und ein theoretisches Molekulargewicht von 6627 D aufweist.

Nach der Trypsin-Verdauung der Substanz und anschließender Massenspektroskopie (ESI MS; "Trypsin-Fingerprinting") bestätigte sich die getroffene Zuordnung vollständig.

Das auf die beschriebene chromatographische Arbeitsweise bestimmbare Apolipoprotein C-I wird im Rahmen der vorliegenden Anmeldung auch als "freies Apolipoprotein C-I" bezeichnet. Es weist die Eigenschaften auf, aus einer Serum- oder Plasma-Probe (in PBS Verdünnung) heraus an hydrophobe Molekülstrukturen,

z.B. die Octylreste eines hydrophoben Octylsepharose-Chromatographier-Materials, gebunden zu werden, von dem es unter typischen Bedingungen für die Elution von Proteinen, insbesondere mit verdünnter Essigsäure, eluiert werden kann. Die Verwendung des Begriffs "freies Apolipoprotein C-I" bedeutet jedoch nicht notwendigerweise, daß das durch hydrophobe Interaktionschromatographie abtrennbare Material in den Ursprungsproben völlig frei vorliegen muss. Assoziante bzw. Aggregate, auch mit Lipiden, die unter den Versuchsbedingungen beim Kontakt mit Octylsepharose unter Bindung des Apolipoproteins C-I an das Chromatographiermaterial aufgebrochen werden, sind ebenfalls als "freies Apolipoprotein C-I" im Sinne der Verwendung dieses Begriffs in der vorliegenden Anmeldung anzusehen.

Die "hydrophoben Molekülstrukturen" können somit auch Teile der Oberfläche eines hydrophoben Chromatographiematerials sein. Sie können aber auch einzelne Moleküle mit hydrophoben Strukturbereichen sein, über die eine Bindung eines solchen Moleküls an Apolipoprotein C-I erfolgen kann, z.B. Moleküle mit hydrophoben Strukturen, die markiert werden können und z.B. in homogenen Assays zur Markierung von Apolipoprotein C-I in einer Probenflüssigkeit dienen können. Die Fähigkeit zur Bindung an "hydrophobe Molekülstrukturen" ist dann vorhanden, wenn die für eine solche Bindung zur Verfügung stehenden Bereiche des Apolipoproteins C-I in der Probe nicht durch andere Substanzen blockiert sind, z.B. die Lipide in Lipoproteinen. Selbst wenn z.B. davon gesprochen wird, dass man solche Anteile an Apolipoprotein C-I bestimmt, die an Octylsepharose binden, bedeutet das nicht, dass man bei der Bestimmung tatsächlich eine Bindung an Octylsepharose ausnutzen muss. Eine solche Angabe ist vielmehr als Charakterisierung der zu bestimmenden Substanz zu verstehen, auch wenn diese nach ganz anderen Verfahren bestimmt wird. Z.B. kann das entsprechende Apolipoprotein C-I das gleiche sein, das auch, wie nachfolgend beschrieben, mittels eines Immunoassays bestimmt wird.

B. IMMUNDIAGNOSTISCHE DIREKTBESTIMMUNGEN VON APOLIPOPROTEIN C-I IN SEREN/PLASMEN

1. Apolipoprotein C-I-Immunoassay

Für die direkte immundiagnostische Bestimmung von Apolipoprotein C-I im Serum wurde aus den nachfolgend beschriebenen Bestandteilen ein Immunoassay vom Sandwich-Typ aufgebaut:

a) Coated Tubes: Polystyrolröhrchen (Greiner) wurden mit einem kommerziell erhältlichen polyklonalen affinitätsgereinigten Antikörper gegen Apolipoprotein C-I (Bezugsquelle: Acris Antibody, Bad Neuheim, Deutschland) beschichtet. Der Antikörper war nach Herstellerangaben durch Immunisierung von Kaninchen mit humanen Apo C-I erhalten und über eine Sepharose-Affinitätssäule mit humanem Apolipoprotein C-I aufgereinigt worden. Zur Beschichtung wurden 0,2 µg Antikörper in 300 µl PBS an Polystyrolröhrchen (Greiner, Deutschland) gebunden, die mit Schaf-Anti-Kaninchen IgG-Antikörper (Sigma) beschichtet waren. Die Bindung wurde nach 18 Stunden bei Raumtemperatur beendet. Anschließend wurden die Röhrchen 2 mal mit je 3 ml 0,5% Rinderserumalbumin (BSA) in PBS gewaschen. Nach ihrer Trocknung in Vakuum wurden die Röhrchen als Festphase für den Apolipoprotein C-I-Immunoassay verwendet.

b) Akridiniumester-markierter Antikörper: 100 µg eines anderen Antikörpers gegen humanes Apolipoprotein C-I (aus Kaninchen; Bezugsquelle: Academie Bio-Medical Company, Texas, USA) in 100 µl PBS wurden mit 10 µg Akridinium-NHS-Ester (in 10 µl Acetonitril) umgesetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Reinigung des markierten Antikörpers unter Abtrennung unumgesetzter Bestandteile der Reaktionsmischung durch HPLC an SW 300 (Waters). Für seine Verwendung im Immunoassay wurde der markierte Antikörper in PBS mit 0,5% BSA und 1 mg/ml Kaninchen IgG zur Absättigung der Röhrchenwände auf ca. 1 Mio. RLU/300 µl (RLU = relative Lichteinheiten) eingestellt.

2. Durchführung der immundiagnostischen Bestimmung von Apolipoprotein C-I in Serum- bzw. Plasma-Proben

Serum- bzw. Plasmaproben wurden 1:10 000 mit PBS, 0,5% BSA verdünnt. Davon wurden jeweils 300 µl in die mit dem immobilisierten Antikörper beschichteten o.g. Röhrchen pipettiert und anschließend für 4 Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln (300 U/min auf einem Heidolph-Kreissschüttler) inkubiert. Der Röhrcheninhalt wurde anschließend mit PBS ausgewaschen (4-maliges Befüllen und Dekantieren mit jeweils 1 ml PBS), und an die Röhrchenwand gebundenes Apolipoprotein C-I wurde innerhalb von 20 Stunden bei Raumtemperatur und 300 U/min mit 300 µl je Röhrchen des akridiniumestermarkierten Anti-Apolipoprotein C-I-Antikörpers umgesetzt. Danach wurde ungebundener markierter Antikörper durch 5-maliges Waschen mit je 1 ml PBS entfernt, und die verbleibende Chemilumineszenz wurde auf bekannte Weise in einem Berthold Luminometer 952 T gemessen.

Zur Kalibrierung des Assays wurde ein synthetisches Apolipoprotein C-I verwendet. Eine typische Standardkurve, wie sie für den obigen Assay erhalten wird, ist in Fig. 3 gezeigt.

3. Ergebnisse

Mit Hilfe des beschriebenen Immunoassays vom Sandwich-Typ wurden Kontrollseren von augenscheinlich gesunden Normalpersonen, wie sie auch bei den chromatographischen Untersuchungen verwendet wurden, sowie Sepsis und Tumorproben vermessen. Die Messungen der Proben von Sepsis-Patienten bestätigen im wesentlichen die Ergebnisse der HPLC-Untersuchungen, indem für Apolipoprotein C-I gegenüber Normalpersonen signifikant verminderte Meßwerte erhalten wurden. Bei der Messung von Proben von Tumor-Patienten, für die bei den chromatographischen Untersuchungen ebenfalls verminderte Konzentrationen ermittelt wurden, wurden jedoch tendenziell erhöhte Meßwerte erhalten. Die Ergebnisse sind in Fig. 4 graphisch dargestellt.

Zur Überprüfung der Frage, ob die unterschiedlichen Ergebnisse für Tumorpatienten bei den chromatographischen Bestimmungen einerseits und den immundiagnostischen Bestimmungen andererseits auf den vorausgegangenen Selektionsschritt mittels hydrophober Interaktionschromatographie zurückzuführen war, wurden die im Immunoassay gemessenen Proben vor einer weiteren Bestimmung zur Bindung "freier" Anteile an Apolipoprotein C-I mit Octylsepharose behandelt.

4. Behandlung der Proben mit Octylsepharose

150 μ l von den gleichen Serum- bzw. Plasmaproben, die wie beschrieben im Immunoassay vermessen worden waren, wurden mit 200 μ l Octylsepharose (Pharmacia, 50 μ l Gel in PBS) vermischt, für eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert, wonach die Octylsepharose mit daran gebundenen Apolipoprotein C-I-Anteilen durch Zentrifugieren (15 min bei 2.000 G) abgetrennt wurde. Der erhaltene Überstand wurde 1:5000 in PBS/0,5% BSA verdünnt und anschließend, wie oben beschrieben, in dem Immunoassay vermessen.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Fig. 5 gezeigt. Es ist zu erkennen, daß durch die Behandlung mit Octylsepharose das gesamte "freie" Apolipoprotein C-I, das bei der Messung mit dem beschriebenen Immunoassay vom Sandwich-Typ erfaßbar ist, an die Octylsepharose gebunden worden war, so dass im Überstand kein Apolipoprotein C-I mehr nachweisbar war. Ähnliche Beobachtungen wurden für die behandelten Sepsis-Proben gemacht, indem der größte Anteil der im Vergleich zu den Normalproben bereits stark verminderten Mengen an bestimmbarer Apolipoprotein C-I durch die Behandlung mit der Octylsepharose aus der Probe entfernt wurde.

Überraschenderweise wurde das in einem Immunoassay der beschriebenen Art bestimmbarer Apolipoprotein C-I durch die Behandlung mit Octylsepharose jedoch nicht aus den Proben von Tumorkranken entfernt.

C. DISKUSSION

Die geschilderten Befunde zeigen, daß wenigstens ein großer Anteil des Apolipoproteins C-I in Seren bzw. Plasmen von Tumorpatienten in einer Form vorliegt, in der es seine Bindefähigkeit an hydrophobe Oberflächen verloren hat, in einem Immunoassay als Immunreaktivität jedoch noch bestimmbar ist. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen wäre, daß bei dem in Seren von Tumorpatienten vorkommenden Apolipoprotein C-I die für hydrophobe Wechselwirkungen zur Verfügung stehenden Molekülbereiche abgesättigt bzw. blockiert sind, und zwar durch Bindungspartner, die von der Octylsepharose nicht verdrängt werden können. Die Natur dieser Bindungspartner ist derzeit noch unbekannt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß es sich um tumorspezifische Substanzen handelt, die als solche oder aufgrund der Inaktivierung hydrophober Bindungspartner, wie z.B. von Apolipoprotein C-I, für die Tumorentwicklung eine wichtige Rolle spielen, z.B. durch eine negative Beeinflussung der natürlichen Immunantwort oder durch aktive Förderung des Tumorstwachstums. Obwohl in den auf immundiagnostischem Wege untersuchten Proben keine signifikante Verminderung des Apolipoprotein C-I-Anteils feststellbar ist, zeigen die parallelen chromatographischen Untersuchungen, daß dieses nicht im o.g. Sinne "frei", sondern in einer anderen Form mit verminderter Bindefähigkeit an hydrophobe Bindungspartner vorliegt. "Freies", d.h. an hydrophobe Bindungspartner bindendes Apolipoprotein C-I ist dagegen, wie bei den anderen Erkrankungen wie z.B. Sepsis, in Seren von Tumorpatienten vermindert.

Es kann aufgrund der geschilderten Befunde vermutet werden, daß es für Tumorpatienten vorteilhaft ist, die bei ihnen gestörte Balance im Sinne eines verminderten Anteils an "freiem" Lipoprotein C-I durch externe Zufuhr von Apolipoprotein C-I auszugleichen, und damit das Krankheitsgeschehen positiv zu beeinflussen, z.B. indem die tumortypischen Bindungspartner durch externes Apolipoprotein C-I abgesättigt werden und zusätzliches freies Apolipoprotein C-I bereitgestellt wird.

Eine ähnliche Annahme, nämlich daß eine externe Zufuhr von Apolipoprotein C-I zum Ausgleich eines gestörten Spiegels an "freiem" Apolipoprotein C-I vorteilhaft ist, gilt auch für die anderen Erkrankungen, z.B. den Fall einer Sepsis. Ist bei Sepsis die Produktion von Apolipoprotein C-I gestört, kann eine externe Zufuhr einen dadurch bedingten Mangel ausgleichen. Ist die Verminderung an "freiem" Apolipoprotein C-I im Serum/Plasma eines Patienten bei Sepsis darauf zurückzuführen, daß das Apolipoprotein C-I durch Bindung an pathologische Gewebstrukturen oder ggf. unlösliche bakterielle Strukturen aus dem Kreislauf entfernt wird, kann eine externe Zufuhr von Apolipoprotein C-I den entstandenen Mangel ausgleichen bzw. eine Absättigung der Bindungsstellen im pathologischen Gewebe oder an den Bakterienstrukturen bewirken. Durch Überwachung der durch externe Zugabe erhöhten Konzentration an freiem Apolipoprotein bzw. als Immunreaktivität bestimmbarem Apolipoprotein in Blutproben des behandelten Patienten kann die jeweils erforderliche Menge auf einfache Weise überwacht werden.

Damit macht die vorliegende Erfindung auch eine neuartige therapeutische Nutzung von Apolipoprotein C-I, oder von geeigneten Derivaten oder sein physiologisches Verhalten simulierenden Verbindungen zur Behandlung von Krebs, Sepsis und anderen Erkrankungen, die mit einer Verminderung des nachweisbaren freien Apolipoproteins C-I gegenüber Gesunden verbunden sind, möglich.

Literaturliste:

1. Erika Polz et al., Human Apolipoprotein C-I: Concentration in Blood Serum and Lipoproteins, *Biochemical Medicine* 24, 229-237 (1980)
2. Kane, J.P., in "Lipid Metabolism in Mammals" (F.Snyder, Ed.), Vol.1, S. 209, Plenum, New York, 1977
3. Shulman, RS et al., The complete amino acid sequence of C-I (apoLP-Ser), an apolipoprotein from human very low density lipoproteins, *J Biol Chem.* 250, 182-190 (1975)
4. Xiao-Ren Pan et al., Abnormal Composition of Apolipoproteins C-I, C-II, and C-III in Plasma and Very-Low-Density Lipoproteins of Non-Insulin-Dependent Diabetic Chinese, *Clin. Chem.* 32, No.10, 1914-1920 (1986)
5. Jutta Poensgen, Apolipoprotein C-I inhibits the hydrolysis by phospholipase A₂ of phospholipids in liposomes and cell membranes, *Biochim.Biophys.Acta*, 1042 (1990), 188-192
6. Ming Liu et al., Activation of plasma lysolecithin acyltransferase reaction by apolipoproteins A-I, C-I and E, *Biochim.Biophys.Acta*, 1168 (1993), 144-152
7. Nina D. Bren et al., Quantification of Human Plasma Apolipoproteins C-I, C-II, and C-III by Radioimmunoassays, *Mayo Clin Proc*, July 1993, Vol.68, 657-664
8. Rampratap S. Kushwaha et al., Characterization of cholesterol ester transfer protein inhibitor from plasma of baboons (*Papio sp.*), *J.Lipid Res.* 1993, 34:1285-1297
9. N. Savion et al., Role of apolipoproteins A-I, A-II and C-I in cholesterol efflux from endothelial and smooth muscle cells, *Eur Heart J* (1993) 14, 930-935

10. Janine H. van Ree et al., Inactivation of *Apoe* and *Apoc1* by two consecutive rounds of gene targeting: effects on mRNA expression levels of gene cluster members, *Human Molecular Genetics*, 1995, Vol.4, No.8, 1403-1409
11. Miek C. Jong et al., Role of ApoCs in Lipoprotein Metabolism - Functional differences Between ApoC1, ApoC2, and ApoC3, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:472-484
12. Thomas Gautier et al., Human Apolipoprotein C-I Accounts for the Ability of Plasma High Density Lipoproteins to Inhibit the Cholesteryl Ester Transfer Protein Activity, *J. Biol. Chem.* 275, No.48, 37504-37509, (2000)
13. Jong M.C. et al., Insights into Apolipoprotein C Metabolism from Transgenic and Gene-Targeted Mice, *Int.J.Tissue React.* XXII (2/3) 59-66 (2000)
14. Neil S. Shachter, Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism, *Current Opinion in Lipidology* 2001, 12:297-304
15. Benjamin W. Atcliffe et al., The interaction of human apolipoprotein C-I with sub-micellar phospholipid, *Eur. J. Biochem.* 268, 2838-2846 (2001)
16. Thomas Gautier et al., Apolipoprotein CI Deficiency Markedly Augments Plasma Lipoprotein Changes Mediated by Human Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) in CETP Transgenic/ApoCI-knocked Out Mice, *J. Biol. Chem.* 277, No.35, 31354-31363 (2002)
17. Puiying A. Mak et al., Regulated Expression of the Apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II Gene Cluster in Murine and Human Macrophages, *J. Biol. Chem.* 277, No.35, 31900-31908 (2002)

18. Johan Björkegren et al., Postprandial Enrichment of Remnant Lipoproteins With ApoC-I in Healthy Normolipidemic Men With Early Asymptomatic Atherosclerosis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:1470-1474
19. John G. Raynes et al., Purification of Serum Amyloid A and Other High Density Apolipoproteins by Hydrophobic Interaction Chromatography, *Analytical Biochemistry* 173, 116-124 (1988)
20. Lothar Thomas (Herausgeber): Labor und Diagnose, 5. erweiterte Auflage, Frankfurt 200, Kapitel 4 Fettstoffwechsel, S.177-190
21. Cesare R. Sitori, Evaluation of Lipoproteins/Apolipoproteins as Therapeutic Agents for the Treatment of Vascular and Nonvascular Disease, *Am J Cardiol.*, Vol 81, 36F-39F (1998)

Patentansprüche

1. Verfahren zur Diagnose, Früherkennung, Risikoabschätzung sowie zur Verlaufskontrolle von Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, dass man in einer Serum- oder Plasmaprobe eines humanen Patienten den Gehalt an Apolipoprotein C-I und/oder an dessen Abkömmlingen bestimmt und aufgrund eines signifikant vom für gesunde Normalpersonen ermittelten Wertebereich abweichenden Ergebnisses der Bestimmung auf das Vorliegen einer Erkrankung schließt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man denjenigen Anteil des gesamten in einer Probe vorhandenen Apolipoproteins C-I bestimmt, der die Fähigkeit zur Bindung an hydrophobe Molekülstrukturen aufweist ("freies Apolipoprotein C-I").
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man denjenigen Anteil des gesamten in einer Probe vorhandenen Apolipoproteins C-I bestimmt, der durch direkte Bestimmung in der Probe mit einem Immunoassay von Sandwichtyp erfaßbar ist ("Apolipoprotein C-I-Immunreaktivität").
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man es zur Diagnose, Früherkennung, Risikoabschätzung sowie zur Verlaufskontrolle von Erkrankungen durchführt, die ausgewählt sind aus der Gruppe, die aus Krebserkrankungen, Sepsis, akuten Herzerkrankungen, Diabetes, Morbus Basedow und Morbus Crohn besteht.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man es zur Diagnose, Früherkennung, Risikoabschätzung sowie zur Verlaufskontrolle von Sepsis durchführt und einen gegenüber gesunden Normalpersonen signifikanten verminderten Anteil an Apolipoprotein C-I, das an

hydrophobe Molekülstrukturen bindet ("freies Apolipoprotein C-I"), und/oder eine verminderten Apolipoprotein C-I-Immunreaktivität in einer Serum- oder Plasmaprobe des Patienten mit einem septischen Zustand korreliert.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man es zur Diagnose, Früherkennung, Risikoabschätzung sowie zur Verlaufskontrolle einer Krebserkrankung durchführt und einen gegenüber gesunden Normalpersonen signifikant verminderten Anteil an Apolipoprotein C-I, das an hydrophobe Molekülstrukturen bindet ("freies Apolipoprotein C-I"), sowie eine erhöhte Apolipoprotein C-I-Immunreaktivität in einer Serum- oder Plasmaprobe des Patienten mit einer Krebserkrankung korreliert.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man im Falle der Feststellung einer erhöhten Apolipoprotein C-I-Immunreaktivität in einer Serum- oder Plasmaprobe eines Patienten den Meßwert durch eine zusätzlichen Kontrollbestimmung überprüft, bei der geprüft wird, ob der Wert für die ermittelbare Immunreaktivität in der Probe durch Behandlung der Probe mit einem Adsorptionsmittel mit hydrophoben Oberflächen signifikant verändert wird, und dass man dann, wenn der Wert nicht oder nicht signifikant vom ursprünglichen Meßwert abweicht, mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Vorliegen einer Krebserkrankung schließt.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass man Apolipoprotein C-I, das an hydrophobe Molekülstrukturen bindet ("freies Apolipoprotein C-I"), dadurch bestimmt, dass man eine Serum- oder Plasmaprobe einer hydrophoben Interaktions-Chromatographie unterwirft, bei der Apolipoprotein C-I an das Chromatographiematerial gebunden wird, und anschließend Apolipoprotein C-I in der eluierten Proteinfraction bestimmt.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man als Chromatographiematerial Octylsepharose verwendet, nicht gebundene Bestandteile der Proben durch Waschen des Chromatographiematerials entfernt, die gebundenen Proteine mit einer verdünnten Säure, insbesondere Essigsäure, eluiert und danach die Menge an Apolipoprotein C-I im Eluat mittels HPLC und/oder immundiagnostisch bestimmt.

10. Verwendung von Apolipoprotein C-I zur Herstellung eines per Injektion zu verabreichenden Medikaments zur therapeutischen Behandlung von Sepsis oder von Krebserkrankungen.

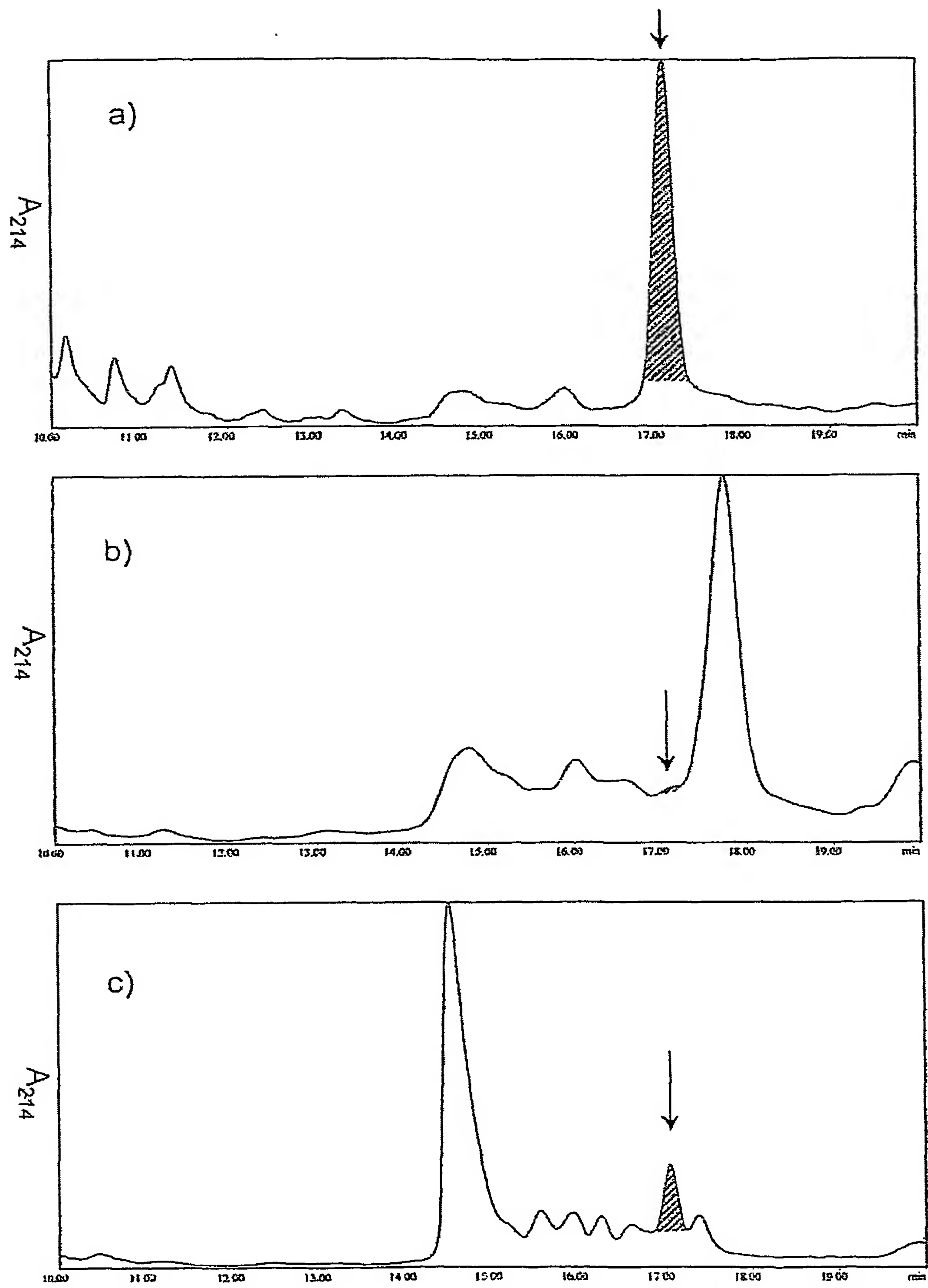


FIG. 1

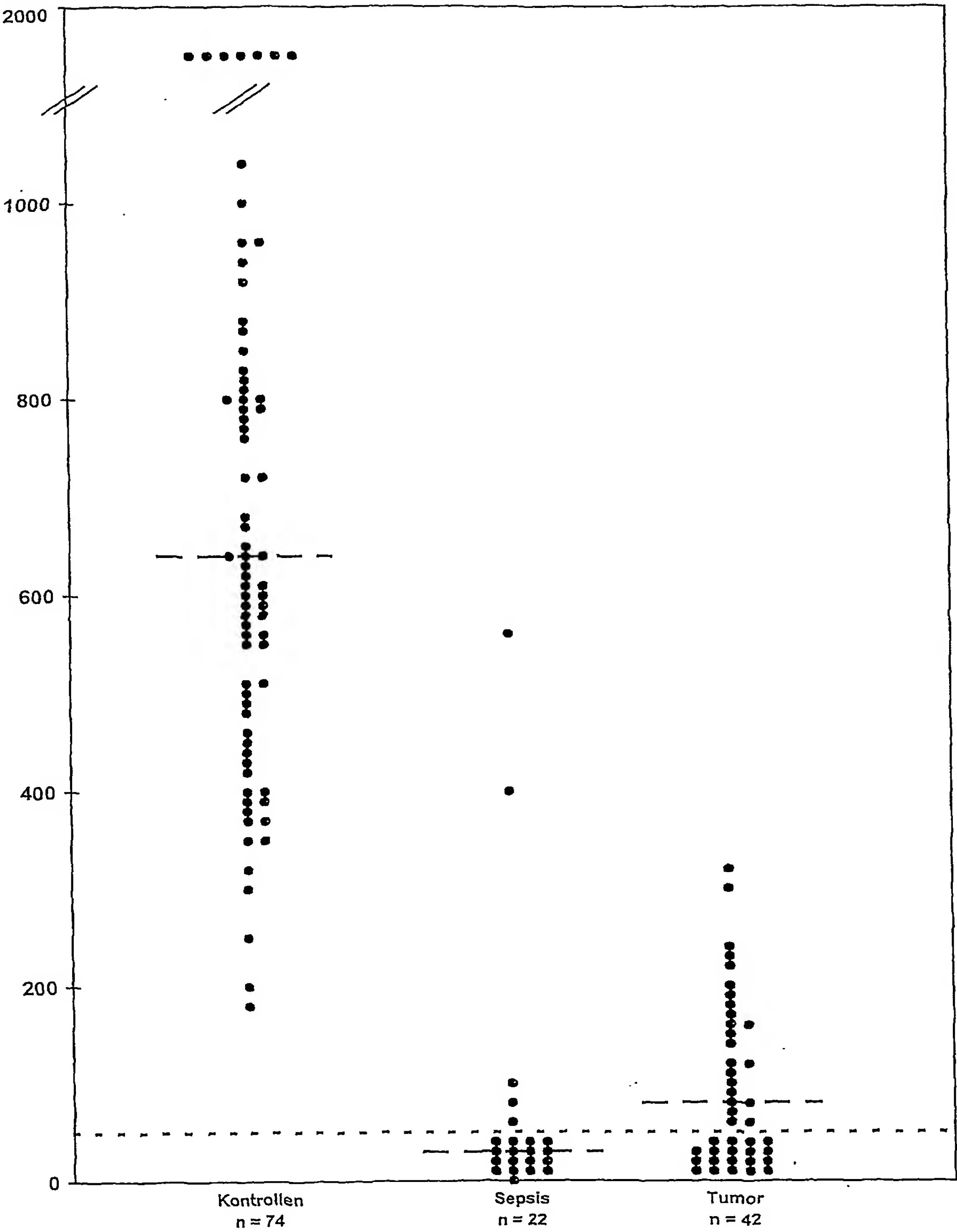


FIG. 2a

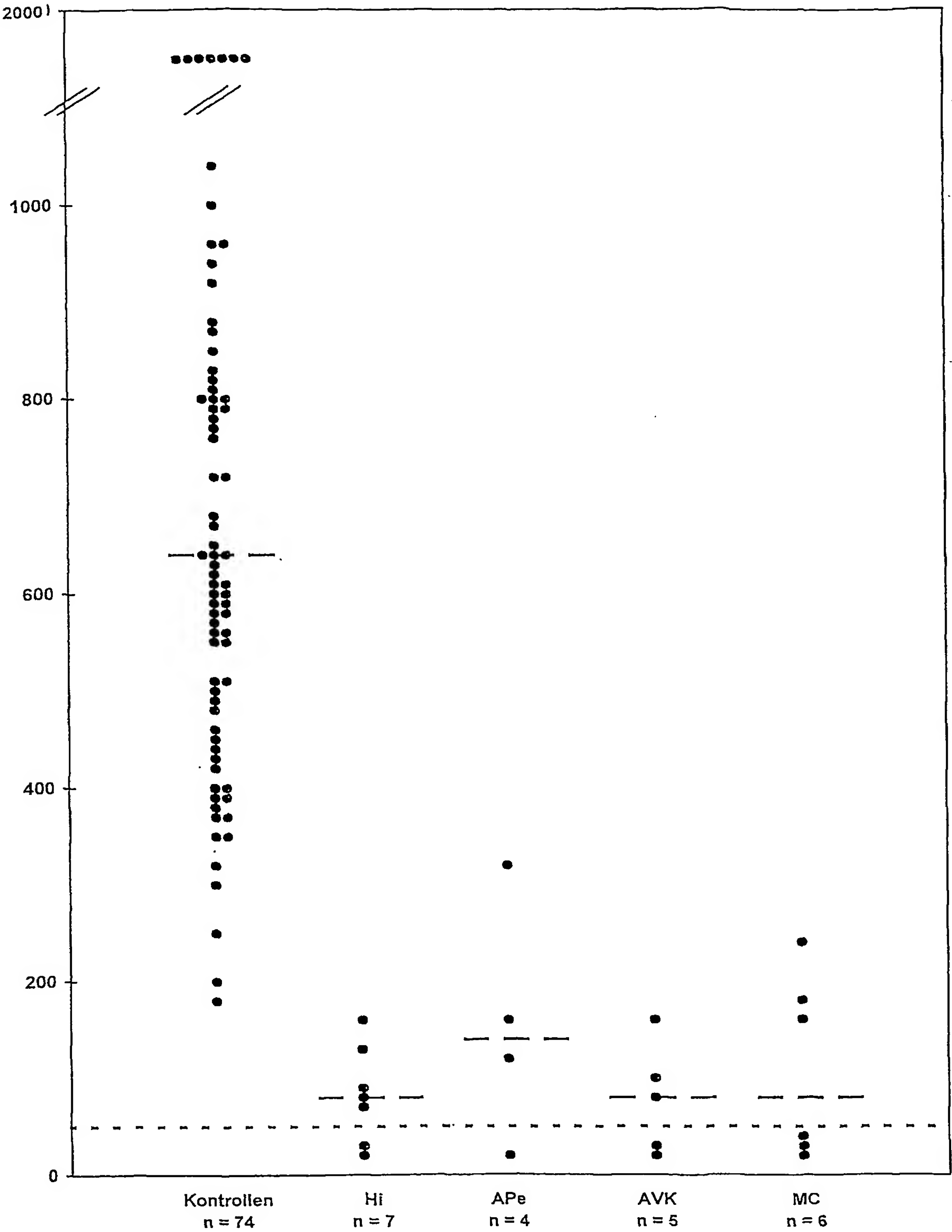


FIG. 2b

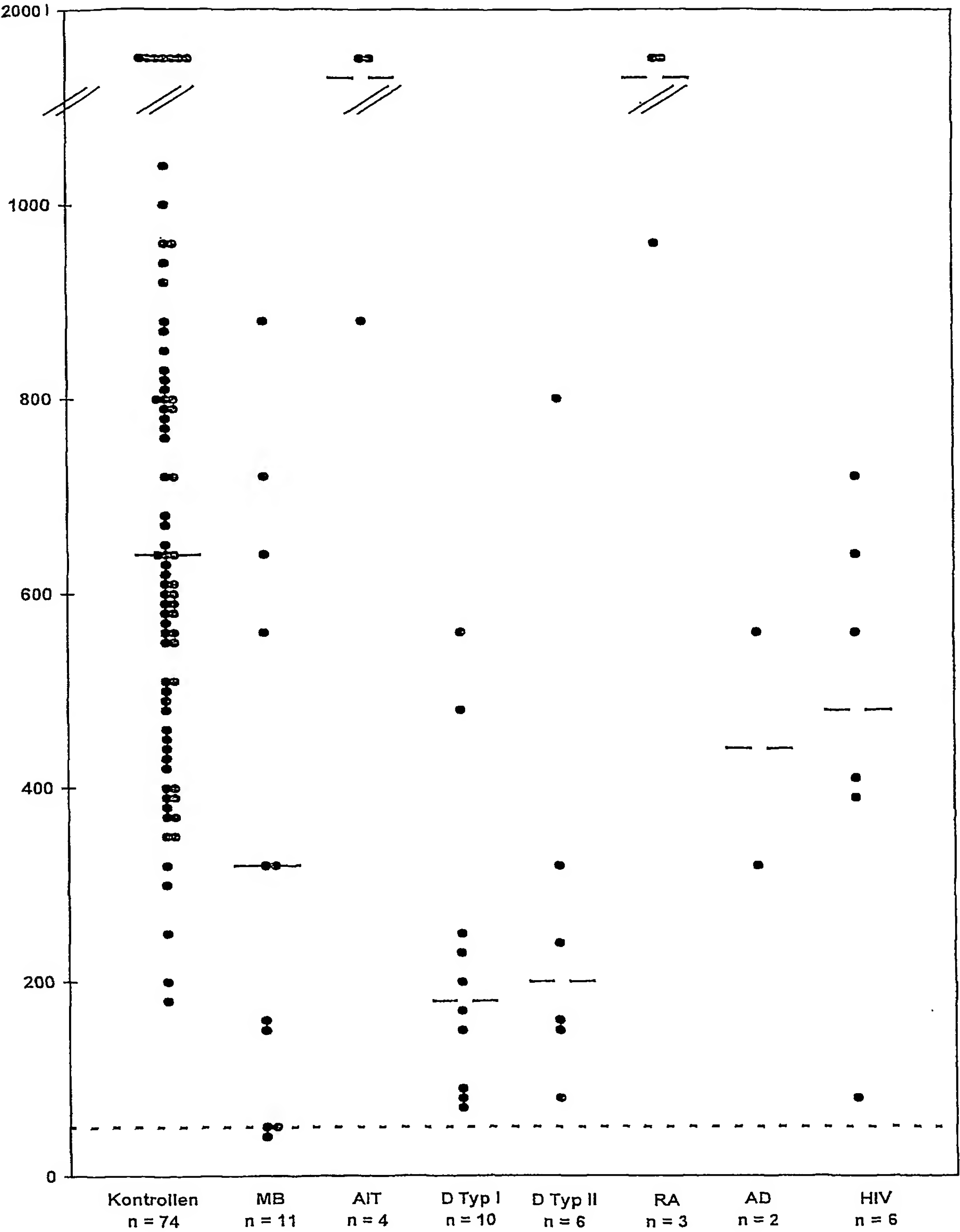


FIG. 2c

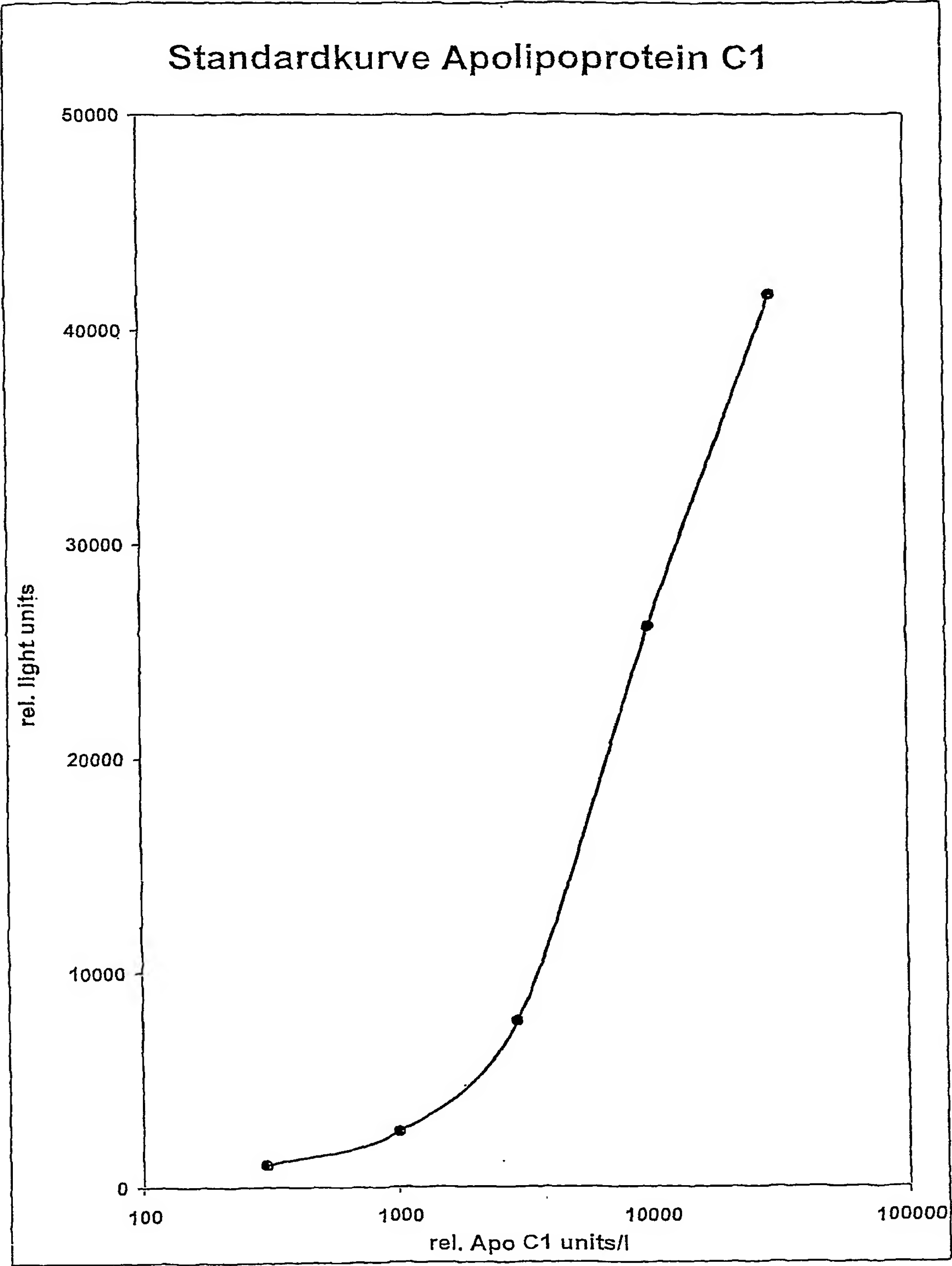


FIG. 3

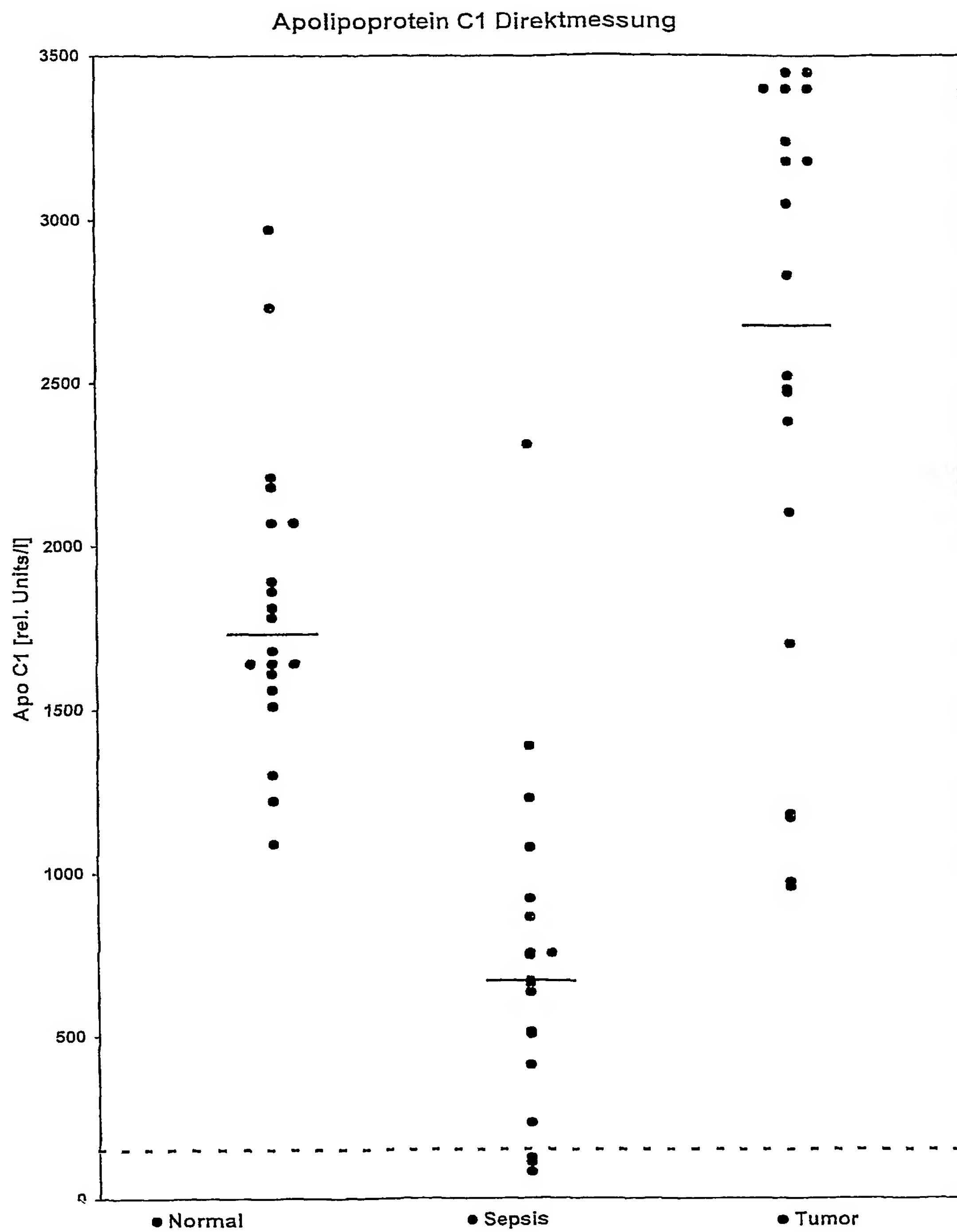


FIG. 4

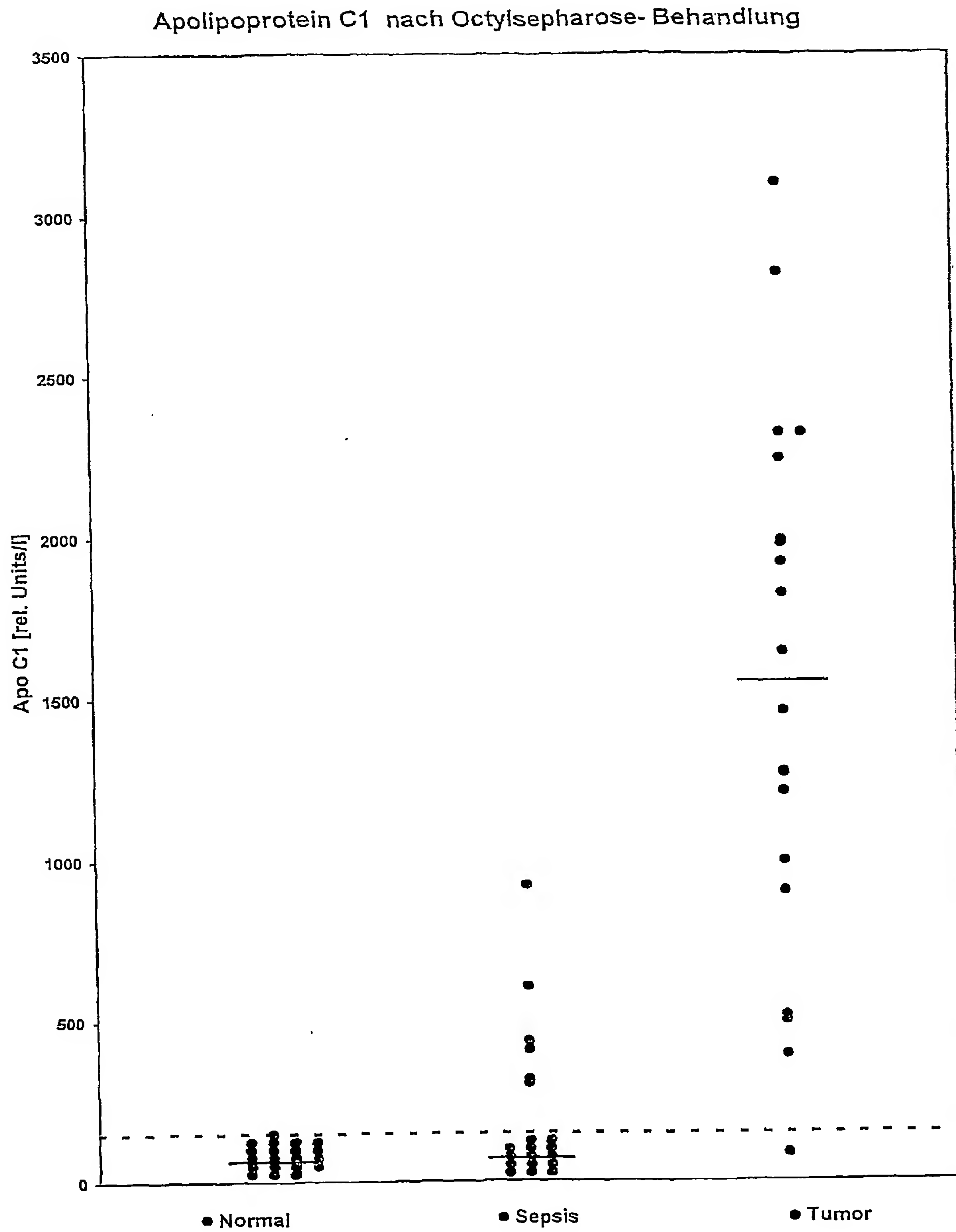


FIG. 5

SEQUENCE LISTING

<110> B.R.A.H.M.S Aktiengesellschaft

<120> Verfahren zur Diagnose von Erkrankungen unter
Bestimmung von Apolipoprotein C-I, und dessen
Verwendung in der Therapie von Erkrankungen

<130> 4118PDE

<140>

<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 57

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Thr Pro Asp Val Ser Ser Ala Leu Asp Lys Leu Lys Glu Phe Gly Asn
1 5 10 15

Thr Leu Glu Asp Lys Ala Arg Glu Leu Ile Ser Arg Ile Lys Gln Ser
20 25 30

Glu Leu Ser Ala Lys Met Arg Glu Trp Phe Ser Glu Thr Phe Gln Lys
35 40 45

Val Lys Glu Lys Leu Lys Ile Asp Ser
50 55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/E 004/009965

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/574

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | BARLAGE S ET AL: "ApoE-containing high density lipoproteins and phospholipid transfer protein activity increase in patients with a systemic inflammatory response." JOURNAL OF LIPID RESEARCH. FEB 2001, vol. 42, no. 2, February 2001 (2001-02), pages 281-290, XP002309046 ISSN: 0022-2275 the whole document | 1-10 |
| X | WO 03/076594 A (SIDRANSKY DAVID ; UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 18 September 2003 (2003-09-18) paragraph [0055] - paragraph [0057]; claims 9,11,18,72,100; table 2 ----- -/-- | 1,3-5, 8-10 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 December 2004

Date of mailing of the international search report

07 FEB 2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schalich, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/E 004/009965

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A | US 2001/005714 A1 (HAUSER HELMUT ET AL) 28 June 2001 (2001-06-28) paragraph [0071] - paragraph [0073] ----- | 1,3-5, 8-10 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP2004/009965

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

6-7 in full

1-4, 8-10 in part

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP2004/009965

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

1. Claims 6 and 7 (in full), 1-4, 8-10 (in part)

apoCI as diagnostic marker for cancerous diseases.

2. Claims 5 (in full), 1-4, 8-10 (in part)

apoCI as diagnostic marker for sepsis.

3. Claims 1-4, 8-10 (in part)

apoCI as diagnostic marker for acute cardiac diseases.

4. Claims 1-4, 8-10 (in part)

apoCI as diagnostic marker for diabetes.

5. Claims 1-4, 8-10 (in part)

apoCI as diagnostic marker for Graves' disease.

6. Claims 1-4, 8-10 (in part)

apoCI as diagnostic marker for Crohn's disease.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/E0004/009965

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|-----------------------------|
| WO 03076594 | A | 18-09-2003 | CA 2478510 A1 18-09-2003 |
| | | | WO 03076594 A2 18-09-2003 |
| | | | US 2004081976 A1 29-04-2004 |
| US 2001005714 | A1 | 28-06-2001 | AU 710061 B2 09-09-1999 |
| | | | AU 2174197 A 22-10-1997 |
| | | | CA 2249459 A1 09-10-1997 |
| | | | CN 1216995 A ,C 19-05-1999 |
| | | | EP 0889906 A1 13-01-1999 |
| | | | WO 9736927 A1 09-10-1997 |
| | | | JP 2000509020 T 18-07-2000 |
| | | | NO 984524 A 30-11-1998 |
| | | | NZ 331980 A 29-09-2000 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/E 004/009965

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/574

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie° | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | BARLAGE S ET AL: "ApoE-containing high density lipoproteins and phospholipid transfer protein activity increase in patients with a systemic inflammatory response." JOURNAL OF LIPID RESEARCH. FEB 2001, Bd. 42, Nr. 2, Februar 2001 (2001-02), Seiten 281-290, XP002309046 ISSN: 0022-2275 das ganze Dokument | 1-10 |
| X | WO 03/076594 A (SIDRANSKY DAVID ; UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 18. September 2003 (2003-09-18) Absatz [0055] - Absatz [0057]; Ansprüche 9,11,18,72,100; Tabelle 2 | 1,3-5, 8-10 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. Dezember 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

07 FEB 2005

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schalich, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/E 004/009965

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|---|--------------------|
| Kategorie° | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| A | US 2001/005714 A1 (HAUSER HELMUT ET AL) 28. Juni 2001 (2001-06-28) Absatz [0071] - Absatz [0073] ----- | 1,3-5, 8-10 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

EP/EP2004/009965

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
 weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
6-7 zur Gänze, 1-4, 8-10 teilweise

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: Ansprüche 6 und 7 (zur Gänze); 1-4, 8-10 (teilweise)

ApoCI als diagnostischer Marker für Krebserkrankungen

2. Ansprüche: Anspruch 5 (zur Gänze), 1-4, 8-10 (teilweise)

ApoCI als diagnostischer Marker für Sepsis

3. Ansprüche: Ansprüche 1-4, 8-10 (teilweise)

ApoCI als diagnostischer Marker für akute Herzerkrankungen

4. Ansprüche: Ansprüche 1-4, 8-10 (teilweise)

ApoCI als diagnostischer Marker für Diabetes

5. Ansprüche: Ansprüche 1-4, 8-10 (teilweise)

ApoCI als diagnostischer Marker für Morbus Basedow

6. Ansprüche: Ansprüche 1-4, 8-10 (teilweise)

ApoCI als diagnostischer Marker für Morbus Crohn

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Patentnummer

PCT/EP2004/009965

| In Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 03076594 | A | 18-09-2003 | CA 2478510 A1 18-09-2003 |
| | | WO 03076594 A2 18-09-2003 | |
| | | US 2004081976 A1 29-04-2004 | |
| US 2001005714 | A1 | 28-06-2001 | AU 710061 B2 09-09-1999 |
| | | AU 2174197 A 22-10-1997 | |
| | | CA 2249459 A1 09-10-1997 | |
| | | CN 1216995 A ,C 19-05-1999 | |
| | | EP 0889906 A1 13-01-1999 | |
| | | WO 9736927 A1 09-10-1997 | |
| | | JP 2000509020 T 18-07-2000 | |
| | | NO 984524 A 30-11-1998 | |
| | | NZ 331980 A 29-09-2000 | |